

ANÁLISE MOLECULAR DE ISOLADOS DO VÍRUS DA MELEIRA DO MAMOEIRO (Papaya meleira virus - PMeV)

Cleidiane Borges Daltro¹; Adriana Fiuza dos Santos²; Karinna Vieira Chiacchio Velame³; Eduardo Chumbinho de Andrade⁴

¹Estudante de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia;

²Estudante de Agronomia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia;

³Bolsista ITEC -2 FAPESB

⁴Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical; (eandrade@cnpmf.embrapa.br)

Introdução

A cultura do mamão (*Carica papaya* L.) no Brasil tem apresentado crescimento expressivo na região Nordeste, responsável por mais de 60% da produção nacional (IBGE, 2008). Certamente, os principais fatores que afetam a expansão da cultura são os problemas fitossanitários, principalmente as viroses. Dentre as espécies de vírus que infectam o mamoeiro no Brasil o vírus da meleira (Papaya meleira virus, PMeV), relatada na década de 80 afetando pomares no sul da Bahia (Nakagawa *et al.*, 1987) e norte do Espírito Santo (Rodrigues *et al.*, 1989), atualmente é a principal doença da cultura em todas as principais regiões produtoras do nordeste.

Os sintomas observados em plantas infectadas pelo vírus são caracterizados por uma exsudação espontânea do látex nos frutos, que posteriormente se oxida, dando um aspecto borrado ou 'melado' ao fruto, do qual deriva o nome da doença. O PMeV é um vírus de partículas isométricas e genoma composto por RNA fita dupla (dsRNA) de aproximadamente 12 Kb, características que fazem este um vírus ser distinto dos demais fitovírus descritos na literatura (Maciel-Zambolim *et al.*, 2003). Experimentos comprovaram a transmissão do vírus pela espécie de mosca branca *Bemisia tabaci*, (Vidal *et al.*, 2005) além de ser transmitido através de ferimentos produzidos por instrumentos perfurantes contaminados.

Apesar dos enormes prejuízos acarretados pelo PMeV na cultura do mamoeiro no Brasil, poucos trabalhos estão sendo dedicados ao estudo molecular deste patógeno. Diante disto o presente trabalho visou realizar estudos moleculares de isolados coletados nas principais regiões produtoras de mamão.

Metodologia

Amostras de látex de mamoeiros com sintomas de meleira foram coletadas nas regiões produtoras de mamão nos estados do Espírito Santo (ES), Bahia (BA) Pernambuco (PE), Rio Grande do Norte (RN) e Ceará (CE). As amostras de látex foram testadas utilizando o método descrito por Rodrigues *et al.* (2005). As amostras positivas foram selecionadas para as análises moleculares, que consistiram na amplificação de uma região do genoma que

codifica parte da replicase viral (RNA polimerase dependente de RNA -RdRp), utilizando o oligonucleotídeo descrito por Teixeira *et al.*, 2007.

Para a síntese do cDNA foram adicionados em um microtubo 5µg de RNA total, 2pmoles do oligonucleotídeo reverso, 4µL do tampão da reação, 1µL de dNTPs a 10mM, 2µL de DTT 0,1M e 200u da enzima transcriptase reversa (M-MLV, Invitrogen), e volume completado para 20µL com água. Na reação de PCR foi utilizado 2,5µL do cDNA, 5µL do tampão da PCR, 3µL de MgCl₂ 25mM, 1µL dos dNTPs (2,5mM), 0,8pmol de cada oligonucleotídeo, 1U de Taq DNA polimerase, e o volume completado para 50µL com água. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

Os fragmentos amplificados foram clonados utilizando o Kit “pGEMT-easy” (Promega) e inseridos em células competentes de *E. coli* DH5α pelo método do choque térmico. A clonagem foi confirmada por meio de extração dos plasmídeos, clivagem com a enzima *Eco* RI e análise dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose 1%.

As sequências obtidas foram comparadas com as presentes no banco de dados de sequência - GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), comparadas e alinhadas entre si utilizando-se o programa ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw) para a obtenção do grau de variabilidade existente e as árvores filogenéticas foram construídas com o auxílio do programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007).

Resultados e Discussão

As coletas das amostras de látex em plantas com sintomas típicos de meleira foram realizadas em diferentes propriedades em cada região. Devido a alta incidência, foram coletadas diversas amostras em cada uma das propriedades visitadas, totalizando 188 amostras. Todas as amostras foram avaliadas para a presença do vírus, que foi detectado em 100% das amostras, e a partir então cada amostra considerada como um isolado. Foram escolhidos isolados representativos de algumas regiões levantadas (Tabela 1) para os trabalhos iniciais de análise molecular e estudos de variabilidade genética.

Tabela 1: Localidades onde foram coletados os isolados.

Isolado	Local de coleta
2	Eunápolis - BA
23	Sooretama - ES
27	Quixeré -CE
36	Bebedouro - ES
47	Miguel Calmon -BA
157	Juazeiro -BA
PMeV-Man	Espírito Santo

No primeiro momento, de cada isolado foi amplificado e sequenciado um fragmento de aproximadamente 600pb, cujas sequências foram então comparadas as depositadas no banco mundial de sequências (GeneBank). As análises das sequências de aminoácidos

deduzidas tiveram maior homologia com a proteína RdRp de espécies de vírus que também possuem genoma composto de dsRNA como o PMeV, mas que infectam fungos, como o Phlebiopsis gigantea mycovirus - PGV, Diplodia scrobiculata virus e Fusarium graminearum mycovirus-3, resultado que reforça a hipótese levantada por Maciel-Zambolin et al., (2003) que o PMeV é um fitovírus bem distinto de qualquer um até o momento já descrito, e pode indicar uma possível origem deste patógeno que até anos atrás não se associava a cultura do mamão.

Posteriormente foi realizada uma análise comparativa entre as sequências de nucleotídeos dos isolados, observando uma conservação relativamente alta, variando entre 72-99% (Tabela 2). Visando verificar se a conservação se mantinha na sequência da proteínas codificada, foram então comparadas as sequências parciais de aminoácidos deduzidos da proteína RdRp, verificando que o nível de conservação entre os isolados nesta região da proteínas se mantinha similar ao observado para nucleotídeo, variando entre 79 -99% (Tabela 2). O isolado 2 foi o teve a menor homologia em relação aos outros isolados, tanto a nível de nucleotídeo quanto á aminoácidos, variando de 72-79 e 79 – 80%, respectivamente.

Isolados	2	23	27	36	47	157	PMeV-Man	PGV
2		80	80	79	80		79	38
23	77		97	89	97		89	39
27	72	99		92	99		92	31
36	79	89	88		91		94	32
47	72	99	99	88			91	31
157	74	74	84	85	84			
PMeV-Man	79	90	90	95	90	82		32
PGV		28	30	20	30	36	34	

As sequências de aminoácidos da RdRp dos isolados foram alinhadas para possibilitar a geração de árvores filogenéticas. As árvores geradas com base nos alinhamentos apresentaram uma topologia similar para ambas proteínas, com os isolados se mantendo nos mesmos ramos e formando os mesmos grupos, de forma que apenas a árvore gerada com a sequência da RdRp está representada na Figura 1.

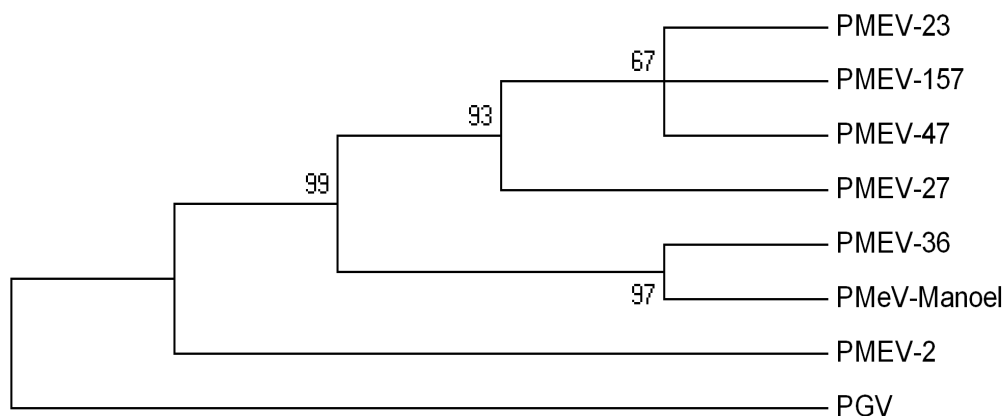


Figura 1. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência parcial de nucleotídeos do gene RdRp dos isolados de Papaya lethal yellow virus (PLYV). Foi utilizado o método “Neighbor-Joining” e bootstrap com 500 repetições. PGV, *Phlebiopsis gigantea* micovirus (GeneBank nº CAJ34335.2)

Conclusões

As análises moleculares iniciais indicam que o PMeV é uma espécie de vírus distinto dos já descritos na literatura, podendo ter sido originado de uma alteração em um vírus que infecta fungo que então passou se replicar no mamoeiro. Além disso, a região genômica do vírus analisada e bem conservada entre os isolados indicando que esta região do genoma viral codifica parte importante da proteína RdRp, podendo ser útil no desenvolvimento de estratégias de resistência derivada do patógeno, como a geração de plantas transgênicas.

Referências

- ARAÚJO, M.M.M; TAVARES, E.T., SILVA, F.R. MARINHO, V.L.A., SOUZA Jr, M.T. Molecular detection of *Papaya meleira virus* in the latex of *Carica papaya* by RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 146:304-310, 2007.
- IBGE, 2010. <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acessado em 20/08/2010.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E.; KUNIEDA-ALONSO, S.; MATSUOKA, K.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Purification and some properties of Papaya maleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. *Plant Pathology* 52:389-394, 2003.
- NAKAGAWA, J., TAKAYAMA, Y. & SUZUKAMA, Y. Exudação de látex pelo mamoeiro. Estudo de Ocorrência em Teixeira de Freitas, BA. IN:Congresso Brasileiro de Fruticultura, 9, Campinas. Anais... Campinas, SP. 1987. pp. 555-559.
- RODRIGUES, C.H., ALVES, F.L., MARIN, S.L.D., MAFFIA, L.A, VENTURA, J.A. & GUTIERREZ, A.S.D. Meleira do mamoeiro no estado do Espírito Santo: enfoque fitopatológico. In:Selecta de Trabalhos sobre a Meleira do mamoeiro. Linhares, EMCAPA. 1989.
- RODRIGUES, S.P., GALVÃO, O.P., ANDRADE, J.S., VENTURA, J.A., FERNANDES, P.M.B. Método molecular simplificado para o diagnóstico da meleira do mamoeiro em látex e tecidos de plantas infectadas. *Summa Phytopathologica*, 31(3):273-275. 2005.
- VIDAL, C.A; NASCIMENTO,A.S. ; HABIBE,T.C. Transmissão do vírus da meleira do mamoeiro (*Carica papaya* L.) por insetos. *Magistra* v.17, n.2, p.101-106,2005.